DADE BEHRING

vWF Ag*

Reagents for the immunoturbidimetric determination of von Willebrand factor antigen (vWF Ag*)

Intended Use

The Dade Behring vWF Ag* test kit is intended for in vitro diagnostic use with Dade Behring coagulation analyzers for the quantitative determination of vWF Ag* in human plasma by immuno-turbidimetry.

Summary and Explanation

von Willebrand factor (vWF) is a glycoprotein secreted into plasma from endothelial cells and megacaryocytes[1]. It has a multimeric form and can have a molecular weight up to 15,000 kDa. After secretion it is vulnerable to digestion by plasmin unless it is not stored in the α-granules of thrombocytes after endocytotic uptake.

The vWF plays an important role both in primary hemostasis by the formation of the hemostatic plug, due to its function in platelet adhesion and aggregation, and in the coagulation process by the stabilization of factor VIII[2].

Qualitative and/or quantitative deficiency in vWF is the cause for the von Willebrand disease (vWD), which is the most common hereditary bleeding disorder, having a frequency estimated to be as high as one person in every hundred[3]. It has an autosomal dominant mode of inheritance. Three principal types of vWD were defined[4].

Whereas the BC von Willebrand reagent (Dade Behring) can be used for determination of von Willebrand ristocetin cofactor activity (vWF:RCo) the vWF Ag* assay is determining the level of specific antigen. Both are necessary for differential diagnosis of vWD subtypes.

vWD type 1 is the most frequent subtype with 70 to 80% of all vWD. It is characterized by a decrease of vWF Ag* and vWF activity. Type 2 refers to a qualitative deficiency of vWF activity, whereby the antigen level still can be normal. vWD type 3 is characterized by a total absence of vWF both in plasma and in the cellular compartments.

Test	Type 1	Type 2 A	Type 2 B	Type 2 N	Type 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	Normal	Absent
vWF:RCo	↓	↓↓	↓ or ↓↓	Normal	Absent
Factor VIII	Normal or ±↓	Normal or ±↓	Normal or ±↓	↓↓	↓↓

Further, it should be mentioned that vWF deficiencies may be associated with various other diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE), myeloma, lymphoma, etc.. These cases may be referred to as acquired von Willebrand diseases. vWF Ag* and vWF activity can be increased in all kinds of inflammatory processes as a result of damages of the vascular endothelium[4]. Besides this patients with myocardial infarction may also show high vWF levels[5].

Principle of the Method

Small polystyrene particles to which specific antibodies have been attached by covalent bonding are agglutinated when mixing with samples containing von Willebrand antigen. This agglutination is then detected turbidimetrically via the increase in turbidity, which is proportional to the antigen level present in the test sample.

Reagents

Materials provided

Code No. OPAB: 4 x 6 mL (2 mL Latex Reagent + 4 mL Diluent) of vWF Ag* reagent.

Composition

The vWF Ag* kit contains the following reagents:

Buffer 4 x 5 mL (Glycine buffer)

Latex Reagent 4 x 2 mL (green screw cap, suspension of small polystyrene particles coated with rabbit anti-human vWF antibodies).

Diluent for Latex Reagent 4 x 4 mL (green screw cap, solution containing glycine intended for dilution of the Latex Reagent)

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use
2. Reagents containing sodium azide must be handled with due caution.
   Do not ingest or allow to contact skin or mucous membranes! If discarded into drain, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Sodium azide can form explosive azides when contacting heavy metals such as copper or lead.

Preparation of the Reagents

Buffer:

Before opening, allow the buffer vial to stand at room temperature (+15 to +25°C) for 15 minutes. Swirl the vial gently.

Latex Reagent:

Pour the whole volume of a vial Diluent for Latex Reagent (green screw cap) into a vial of Latex Reagent (also green screw cap) of the same kit. Ensure that the dilution liquid is completely transferred into the Latex Reagent vial. Then, swirl the mixture in the Reagent vial without creating any bubbles. Allow the final solution to stand at room temperature (+15 to +25°C) for 15 minutes and swirl gently afterwards.

Diluent for Latex Reagent:

This diluent is ready for use.

Storage and Stability

When stored at +2 to +8°C the reagents in intact vials are stable until the expiration date indicated on the box label.

Stability after reconstitution / once opened (closed vials)

+2 to +8 °C 15 days

+15 to +25 °C 7 days

Various analyzer do have individual stability data.

Specimens

To separate the plasma, mix 1 part sodium citrate solution (0.109 mol/L, i.e., 3.2%) with 9 parts venous blood, taking care to avoid the formation of foam. Centrifuge at 2500 x g for at least 10 minutes, remove the supernatant plasma, and keep at +15 to +25°C until required in the assay, but not longer than 8 hours. Plasma samples can be kept at +2 to +8°C for up to 24 hours or alternatively stored deep frozen up to 1 month at –20 to –30°C. Frozen plasmas must be thawed directly at +37°C for at least 15 minutes and mixed before testing.

Procedure

Always refer to the appropriate chapters of the Operator's Manual, particularly those for calibration, loading and quality control.

Materials required but not provided

Buffer: Dade® Owren's Veronal Buffer (Code No. B 4234-25)

For calibration: Standard Human Plasma (Code No. ORKL)

For quality control: Control Plasma N (Code No. ORKE) and P (Code No. OUPZ)

Dade Behring Coagulation Analyzer having an application for vWF Ag*.

Coagulation Analyzer

Dade Behring's vWF Ag* can be used with a variety of coagulation analyzers. Please follow the Operator's Manual.

Calibration

Assay calibration is performed with Dade Behring's Standard Human Plasma (calibrated against WHO Standard 97/586). The standard dilutions are automatically prepared by the Dade Behring coagulation analyzers by dilution with Dade® Owren's Veronal Buffer, according to the parameters entered in the analyzers for this assay. The buffer alone represents the 0%-point.

The calibration curve can be examined on the analyzers respectively the PC screen in the Calibration menu (see appropriate Operator's Manual).

Patient samples

Patient plasmas are used undiluted. Dilutions with Dade® Owren's Veronal Buffer are automatically prepared by the Dade Behring coagulation analyzers. Patients plasmas are identified by the Dade Behring coagulation analyzers either by scanning their bar codes across the bar code reader or by manually entering their identifications on the keyboard.

Internal Quality Control

It is necessary to run controls to ensure accuracy and reproducibility of the results. Two different levels of controls should be included in each work-shift. Use Control Plasma N and P. Prepare the controls and transfer to the Dade Behring coagulation analyzers the information contained in the control plasma kits. These controls are used undiluted. Dilutions are being prepared automatically by the Dade Behring coagulation analyzers.

If the result of the controls is outside the confidence interval, the determination must be repeated. If the repeated determination confirms the deviation, a new reference curve should be established. Do not release patient results until the cause of deviation has been identified and corrected.

Results

The vWF Ag* assay is automatically carried out by the Dade Behring analyzers as soon as the samples have been loaded and the results are shown on the screen.

Limitations of the Procedure and High-Dose-Hook Effect

Suitable coagulation analyzers are those for which assay protocols are provided by Dade Behring. The use of vWF Ag* on other coagulation analyzers must be validated by the test laboratory. In such cases, the performance characteristics may differ from those stated.

Please refer to the Operator's Manual of your Dade Behring Coagulation Analyzer or to the application sheet of vWF Ag* with respect to the possible influence of the high-dose-hook effect, hemoglobin, bilirubin, lipaemia or heparin.

The extremely rare presence of anti-bovine albumin and/or anti rabbit antibodies in certain subjects may lead to an over-estimation of vWF Ag*. Furthermore, the presence of rheumatoid factor may lead to an overestimation of vWF Ag*[6].

Expected Values

Reference values vary from laboratory to laboratory depending on technique used, therefore, each laboratory should establish its own reference interval. (For more information on establishing reference intervals see NCCLS document C28-A, How to define and determine Reference intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline).

The vWF Ag* plasma level increases with age, postmenopausal, physical exercises, and stress[7].

The normal plasma vWF level in the adult population is usually in the range of 50 – 160% [8,9].

Specific Performance Characteristics

Measuring Range

Please refer to the Operator's Manual of your Dade Behring Coagulation Analyzer or to the application sheet of vWF Ag*.

Specificity

The vWF Ag* determines specifically the vWF antigen level in the test plasma sample.

Precision

Precision studies were performed with Dade Behring coagulation analyzers by evaluation of Control Plasma P and Control Plasma N.

The coefficient of variation (CV) within run (intra-assay precision) ranged from 1,4 % to 4,2 %, while the coefficient of variation from day to day (inter-assay precision) ranged from 0,9 % to 4,2 %.

Bibliography

1. Verweij CL: Biosynthesis of human von Willebrand factor. Haemostasis 1988; 18: 224-245.
2. Ruggeri ZM, Ware J: The structure and function of von Willebrand factor. Thromb. Haemostasis 1992; 67: 594-599.
3. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL et al.: Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. J. Pediatr. 1993; 123: 893-898.
4. Blann A: Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. Br. J. Biomed. Sci. 1993; 50: 125-134.
5. Lip GYH, Blann AD: Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. Br. Heart J. 1995; 74: 580-583.
6. Favaloro EJ, Aboud M, Arthur C: Possibility of potential VWD misdiagnosis or misclassification using LIA technology and due to presence of rheumatoid factor. Am. J. Hematol. 2001; 66: 53-56.
7. Wamala S, Murray MA, Horsten M et al.: Socioeconomic status and determinants of hemostatic function in healthy women. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999; 19: 485-492.
8. Holmberg L, Berntorp E, Donner M, Nilsson IM: von Willebrand's disease characterized by increased ristocetin sensitivity and the presence of all von Willebrand factor multimers in plasma. Blood 1986; 68 (3): 668-672.
9. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D: New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. Blood 1989; 74(5): 1591-1599.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

USA Distributor: Dade Behring Inc.
Newark, DE 19714 U.S.A.

vWF Ag*

Reagenzien zur immunoturbidimetrischen Bestimmung des von-Willebrand-Faktor-Antigens (vWF Ag*)

Anwendungsbereich

Der vWF Ag*- Test-Kit von Dade Behring wird zusammen mit den Gerinnungsmessgeräten von Dade Behring in der in-vitro-Diagnostik eingesetzt und dient der quantitativen Bestimmung des vWF Ag* in Humanplasma mittels Immunturbidimetrie.

Diagnostische Bedeutung

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, das von Endothelzellen und Megakaryozyten in das Plasma sezerniert wird[1]. Es handelt sich um eine Multimerstruktur mit einem Molekulargewicht von bis zu 15.000 kDa. Nach der Sezernierung kann sie durch Plasmin abgebaut werden, es sei denn, es erfolgt eine endozytotische Aufnahme in die α-Granulen der Thrombozyten.

Aufgrund seiner Funktion bei der Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen, spielt der vWF sowohl in der primären Hämostase bei der Bildung eines hämostatischen Pfropfes als auch im Gerinnungsprozess durch die Stabilisierung des Faktors VIII eine wichtige Rolle[2].

Der qualitative und/oder quantitative Mangel an vWF verursacht das von-Willebrand-Syndrom (vWS), das eine der häufigsten erblichen Blutgerinnungsstörungen darstellt mit einer geschätzten Häufigkeit von einer Person unter Hundert[3]. Sie wird autosomal-dominant vererbt. Drei Grundtypen des vWS sind bekannt[4].

Während man mit dem BC-von-Willebrand-Reagenz (Dade Behring) die Aktivität des von-Willebrand-Ristocetin-Kofaktors (vWF:Rco) bestimmen kann, wird der vWF Ag*-Test zur Bestimmung des Gehaltes des spezifischen Antigens verwendet. Für die Differentialdiagnose der verschiedenen vWS-Subtypen sind beide Tests notwendig.

Der vWS Typ 1 ist mit 70 bis 80 % der am häufigsten vorkommende Subtyp. Bei dieser Form ist das vWF Ag* vermindert. Der vWS Typ 2 ist durch einen qualitativen Mangel der vWF-Aktivität gekennzeichnet, wobei der Antigengehalt sich aber durchaus im Normalbereich befinden kann. Bei vWS Typ 3 fehlt der vWF sowohl im Plasma als auch in der zellulären Granula völlig.

Test	Typ 1	Typ 2 A	Typ 2 B	Typ 2 N	Typ 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	Normal	Fehlt
vWF:Rco	↓	↓↓	↓ oder ↓↓	Normal	Fehlt
Faktor VIII	Normal oder ±↓	Normal oder ±↓	Normal oder ±↓	↓↓	↓↓

Darüber hinaus ist anzumerken, dass ein Mangel von vWF auch mit verschiedenen anderen Krankheiten in Zusammenhang stehen kann, wie beispielsweise mit systemischem Lupus erythematosus (SLE), Myelom, Lymphom, etc. In diesen Fällen spricht man von einem erworbenem von-Willebrand-Syndrom. Als Folge von Schädigungen des Gefäßendothels kann vWF Ag* und die vWF-Aktivität bei allen Arten von entzündlichen Vorgängen erhöht sein[4]. Patienten mit einem Myokardinfarkt können ebenfalls erhöhte vWF-Konzentrationen aufweisen[5].

Prinzip der Methode

Durch Mischen der Probe, die das von-Willebrand-Antigen enthält, mit dem Reagenz verklumpen kleine, mit Antikörpern versehene Polystyrol-Partikel. Die spezifischen Antikörper sind durch kovalente Bindungen mit den Partikeln verbunden. Anschließend wird diese Agglutination turbidimetrisch über die Erhöhung der Trübung bestimmt. Die Trübung verhält sich direkt proportional zum Antigenspiegel in der Probe.

Reagenzien

Inhalt der Handelspackung

Bestell-Nr. OPAB: 4 x 6 ml (2ml Latex Reagenz + 4ml Diluent) vWF Ag*- Reagenz

Zusammensetzung

Der vWF Ag*-Kit enthält die folgenden Reagenzien:

4 x 5 ml Puffer (Glyzinpuffer)

4 x 2 ml Latex-Reagenz (grüner Schraubverschluss, Suspension kleiner Polystyrol-Partikel, die mit Anti-Human-vWF-Antikörpern (Kaninchen) beschichtet sind.

4 x 4 ml Diluent für Latex-Reagenz (grüner Schraubverschluss, Lösung enthält Glyzin, wird zur Verdünnung des Latex-Reagenz verwendet)

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung.
2. Beim Umgang mit Natriumazid-haltigen In-vitro-Diagnostika ist zu beachten: Verschlucken und Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden! Bei Entsorgung ins Abwasser mit viel Wasser nachspülen. Natriumazid kann mit Schwermetallen wie Kupfer oder Blei explosive Azide bilden.

Vorbereitung der Reagenzien

Puffer:

Das Pufferfläschchen vor dem Öffnen 15 Minuten bei Raumtemperatur (+15 bis +25°C) stehen lassen.

Fläschchen leicht schütteln.

Latex-Reagenz:

Den gesamten Inhalt des Diluent-Fläschchens (grüner Schraubverschluss) in das Fläschchen mit dem Latex-Reagenz (ebenfalls grüner Schraubverschluss) desselben Kits geben. Die Mischung anschließend im Reagenz-Fläschchen schütteln, wobei Blasenbildung zu vermeiden ist. Die fertige Lösung bei Raumtemperatur (+15 bis +25°C) 15 Minuten offen stehen lassen. Danach leicht schütteln.

Diluent für Latex-Reagenz:

Diluent wird gebrauchsfertig geliefert.

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Bei Lagerung zwischen +2 und +8°C bleiben die Reagenzien bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Haltbarkeit nach Verdünnung / nach Öffnung (in geschlossenem Gefäß)

bei +2 bis +8°C 15 Tage

bei +15 bis +25°C 7 Tage

Die verschiedenen Gerinnungsmessgeräte haben individuelle Stabilitätsdaten.

Untersuchungsmaterial

Zur Abtrennung des Plasmas einen Teil Natriumcitratlösung (0,109mol/l oder 3,2 %) mit neun Teilen venösem Blut mischen, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist. Bei 2500 x g mindestens 10 Minuten zentrifugieren, den Plasmaüberstand entfernen und bei +15 bis +25°C bis zum Testeinsatz, jedoch nicht länger als 8 Stunden, aufbewahren. Bei Lagerung zwischen +2 und +8°C können Plasmaproben bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden. In tiefgefrorenem Zustand (–20 bis –30°C) beträgt die Haltbarkeit bis zu einem Monat. Tiefgefrorenes Plasma bei +37°C mindestens 15 Minuten vor dem Test auftauen und mischen.

Testdurchführung

In jedem Falle sind die entsprechenden Kapitel des Benutzerhandbuches zu beachten, vor allem die Abschnitte zu Kalibrierung, Beladung und Qualitätskontrolle.

Zusätzlich benötigte Materialien

Puffer:	Dade® Owren's Veronal Buffer (Bestell-Nr. B 4234-25)
Für die Kalibrierung:	Standard Human Plasma (Bestell-Nr. ORKL)
Für die Qualitätskontrolle:	Kontrol Plasma N (Bestell-Nr. ORKE) und P (Bestell-Nr. OUPZ)

Dade Behring Gerinnungsmessgerät mit vorgesehener Anwendung für vWF Ag*.

Gerinnungsmessgerät

Der vWF Ag*-Test kann mit verschiedenen Gerinnungsmessgeräten durchgeführt werden. Nähere Informationen dazu im Benutzerhandbuch.

Kalibrierung

Die Kalibrierung des Tests wird mit Standard Human Plasma von Dade Behring durchgeführt (Kalibrierung gegen den WHO-Standard 97/586). Die Standard-Verdünnungen werden von den Gerinnungsmessgeräten von Dade Behring automatisch, gemäß den bereits in den Geräten eingegebenen Parametern für diesen Test mit Dade® Owren's Veronal Buffer hergestellt. Der Puffer stellt den 0 %-Punkt dar.

Die Kalibrationskurve kann am Analyzer selbst oder am PC-Bildschirm unter dem Menü "Kalibrierung" überprüft werden (siehe entsprechendes Benutzerhandbuch).

Patientenproben

Patientenplasma unverdünnt verwenden. Verdünnungen mit Dade® Owren's Veronal Buffer werden von den Dade Behring Gerinnungsmessgeräten automatisch hergestellt. Patientenplasmen werden von den Dade Behring Gerinnungsmessgeräten entweder durch Scannen des Barcodes mittels Barcode Reader oder durch manuelle Eingabe der Daten mittels Tastatur identifiziert.

Interne Qualitätskontrolle

Um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sind Kontrollen notwendig. Nach jeder Kalibration und mindestens alle 8 Stunden pro Testtag sind Kontrollen mit zwei verschiedenen Werten durchzuführen. Dafür sind Kontroll Plasma N und P zu verwenden. Die Kontrollplasmen vorbereiten und die in den Kontrollplasma-Kits enthaltenen Informationen in die Dade Behring Gerinnungsmessgeräten eingeben. Die Kontrollen sind unverdünnt anzuwenden. Die Dade Behring Gerinnungsmessgeräte stellen die Verdünnungen automatisch her.

Liegt das Ergebnis der Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereichs, ist die Bestimmung zu wiederholen. Wird die Abweichung durch erneute Bestimmung bestätigt, sollte eine neue Referenzkurve erstellt werden. Die Ergebnisse der Patientenproben niemals freigeben, bevor der Grund der Abweichung eruiert und korrigiert wurde.

Ergebnisse

Der vWF Ag*-Test wird nach der Beladung mit den Proben von den Dade Behring Gerinnungsmessgeräten automatisch durchgeführt und die Ergebnisse angezeigt.

Einschränkungen der Testdurchführung und High-Dose-Hook-Effekt

Für diese Bestimmungen geeignet sind Gerinnungsmessgeräte, für die Dade Behring Testprotokolle zur Verfügung stellt. Die Bestimmung des vWF Ag* auf anderen Gerinnungsmessgeräten ist vom Testlabor zu validieren. In diesen Fällen weichen die Leistungsmerkmale möglicherweise von den angegebenen ab.

Hinsichtlich einer möglichen Beeinträchtigung durch den High-Dose-Hook-Effekt, Hämoglobin, Bilirubin, Lipämie oder Heparin bitte das Benutzerhandbuch des jeweiligen Dade Behring Gerinnungsmessgerätes oder das Application Sheet beachten.

Das in Patientenproben höchst seltene Vorkommen von Anti-Rinder-Albumin und/oder Anti-Kaninchen-Antikörpern kann zu einem überhöhten vWF Ag*-Wert führen. Auch Rheumafaktor im Blut kann zu einer Überbewertung von vWF Ag* führen[6].

Erwartete Werte

Je nach angewandter Bestimmungsmethode variieren die Referenzwerte von Labor zu Labor. Daher sollte jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich bestimmen. (Weiterführende Informationen zur Bestimmung eigener Referenzintervalle sind dem NCCLS-Dokument C28-A "How to define and determine Reference intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline" zu entnehmen.

Der vWF Ag*-Plasmaspiegel erhöht sich mit dem Lebensalter, nach der Menopause, sowie bei sportlichen Übungen und unter Stress[7].

Der normale vWF-Plasmaspiegel bewegt sich üblicherweise zwischen 50 und 160 %[8,9].

Leistungsmerkmale des Tests

Messbereich

Diesbezüglich bitte das entsprechende Benutzerhandbuch Ihres Dade Behring Gerinnungsmessgerätes oder die Produktinformation zu vWF Ag* beachten.

Spezifität

Der vWF Ag*-Test dient zur spezifischen Bestimmung des vWF-Antigenspiegels in Plasmaproben.

Präzision

Mit Dade Behring Gerinnungsmessgeräten wurden Präzisionsstudien durchgeführt. Dabei wurden Kontroll Plasma N und Kontroll Plasma P evaluiert.

Der Variationskoeffizient (VK) innerhalb eines Laufes (Intra-Assay-Präzision) betrug zwischen 1,4 % und 4,2 %.

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag (Inter-Assay-Präzision) betrug zwischen 0,9 % und 4,2 %.

Literatur

siehe Seite 1

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

Ausgabe Juni 2002

vWF Ag*

Réactifs pour le dosage immuno-turbidimétrique de l'antigène Facteur de von Willebrand (vWF Ag*)

Domaine d'utilisation

Le test vWF Ag* de Dade Behring est un test de diagnostic *in vitro* à utiliser sur les automates de coagulation Dade Behring, et permet le dosage du vWF Ag* dans le plasma humain par immuno-turbidimétrie.

Intérêt diagnostique

Le Facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine sécrétée dans le plasma par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes[1].

Il s'agit d'une structure multi-mérique d'un poids moléculaire allant jusqu'à 15 000 kDa. Une fois sécrétée, elle peut être dégradée par la plasmine, à moins qu'elle ne soit absorbée endocytotiquement dans les α-granules des thrombocytes.

Du fait de sa fonction dans l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines, le vWF joue un rôle important, aussi bien dans l'hémostase primaire lors de la formation du bouchon hémostatique, que dans le processus de coagulation par la stabilisation du Facteur VIII [2].

Un déficit qualitatif et/ou quantitatif en vWF provoque la maladie de von Willebrand qui est un des troubles congénitaux de la coagulation sanguine les plus fréquents, avec une fréquence estimée à une personne sur cent[3]. Sa transmission est héréditaire, autosomale dominante. Il existe trois principaux types de la maladie de von Willebrand[4].

Alors que le Réactif BC-von Willebrand (Dade Behring) permet de mesurer l'activité du cofacteur de la ristocétine du Facteur de von Willebrand (vWF:Rco), le test vWF Ag* permet de déterminer le taux de l'antigène spécifique. Les deux tests sont nécessaires pour un diagnostic différentiel des différents sous-types de la maladie de von Willebrand.

La maladie de vW de type 1, qui apparaît dans 70 à 80% des cas, est le sous-type le plus fréquent. Dans cette forme, le vWF Ag* est diminué. La maladie de vW de type 2 est caractérisée par un déficit qualitatif en activité de vWF, alors même que le taux d'antigène peut se trouver dans le domaine normal. Dans la maladie de vW de type 3, le vWF est totalement absent aussi bien du plasma que des granules cellulaires.

Test	type 1	type 2 A	type 2 B	type 2 N	type 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	normal	absent
vWF:Rco	↓	↓↓	↓ ou ↓↓	normal	absent
Facteur VIII	normal ou ±↓	normal ou ±↓	normal ou ±↓	↓↓	↓↓

Par ailleurs, il faut souligner qu'un déficit en vWF peut s'accompagner de différentes autres maladies, comme par ex. le lupus érythémateux systémique (LES), un myélome, un lymphome, etc. Dans ces cas-là, on parle de maladie de von Willebrand acquise. Comme conséquence des lésions de l'endothélium vasculaire, le vWF Ag* peut être augmenté dans toutes les formes des processus inflammatoires[4]. Une augmentation de la concentration de vWF peut également être observée chez les patients souffrant d'un infarctus du myocarde[5].

Principe de la méthode

L'addition de réactif à l'échantillon qui contient l'antigène de von Willebrand entraîne l'agglutination des petites particules de polystyrène recouvertes d'anticorps spécifiques, fixés par liaison covalente. Cette agglutination est mesurée turbidimétriquement, par augmentation de la turbidité. La turbidité est directement proportionnelle au taux d'antigène dans l'échantillon.

Réactifs

Conditionnement

Code OPAB : 4 x 6 ml (2 ml de Réactif Latex + 4 ml de Diluant) vWF Ag*- Réactif

Composition

Le coffret vWF Ag* contient les réactifs suivants :

4 x 5 ml de Tampon (tampon glycine)

4 x 2 ml de Réactif Latex (bouchon à vis vert) : suspension de petites particules de polystyrène recouvertes d'anticorps (de lapin) anti- vWF humain.

4 x 4 ml de Diluant pour Réactif Latex (bouchon à vis vert : solution contenant de la glycine, pour la dilution du Réactif Latex)

Mises en garde et précautions d'emploi

1. Réservé à un usage *in vitro.*
2. Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être manipulés avec précaution : ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses ! En cas d'évacuation dans l'évier, rincer avec beaucoup d'eau. L'azide de sodium peut devenir explosif au contact de métaux lourds comme le cuivre ou le plomb.

Préparation des réactifs

Tampon :

Laisser le flacon de Tampon pendant 15 minutes à la température ambiante (+15/+25°C), puis l'agiter avec précaution avant de l'ouvrir.

Réactif Latex :

Verser la totalité du contenu d'un flacon de Diluant (bouchon à vis vert) dans le flacon de Réactif Latex (également bouchon à vis vert) du même coffret. Agiter ensuite le mélange dans le flacon de Réactif Latex, en évitant le barbotage de l'air. Laisser reposer la solution dans le flacon ouvert pendant 15 minutes à la température ambiante (+15/+25°C), puis agiter légèrement.

Diluant pour Réactif Latex :

Le Diluant est prêt à l'emploi.

Stabilité et conditions de conservation

Conservés à +2/+8°C, tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Stabilité après dilution/après ouverture (dans flacon fermé)

15 jours à +2/+8°C

7 jours à +15/+25°C

Les automates de coagulation ont chacun leurs propres données de stabilité.

Echantillons à tester

Pour l'obtention des plasmas, mélanger un volume de solution de citrate de sodium (0,109 mol/l ou 3,2%) avec neuf volumes de sang veineux en évitant la formation de mousse. Centrifuger pendant au moins 10 minutes à 2500 g, prélever le plasma surnageant, et le conserver 8 heures maximum à +15/+25°C jusqu'au moment du test. Conservés à +2/+8°C, les plasmas peuvent être utilisés pendant 24 heures. Conservés congelés (-20/-30°C), ils restent stables jusqu'à un mois. Les plasmas congelés doivent être décongelés à +37°C au moins 15 minutes avant le test, puis homogénéisés.

Réalisation du test

Dans tous les cas, respecter les instructions du manuel d'utilisation de l'automate utilisé, en particulier les paragraphes concernant l'étalonnage, le chargement et le contrôle de qualité.

Autres réactifs et matériel nécessaires

Tampon :	Dade® Tampon véronal d'Owren (code B 4234-25)
Pour l'étalonnage :	Plasma standard humain (code ORKL)
Pour le contrôle de qualité :	Plasmas de contrôle N (code ORKE) et P (code OUPZ)

Automate de coagulation Dade Behring pouvant effectuer le test wVF Ag*.

Automate de coagulation

Le test vWF Ag* peut être effectué avec différents automates de coagulation. Pour plus d'informations, se reporter au manuel d'utilisation de l'automate utilisé.

Etalonnage

L'étalonnage du test est effectué à l'aide du Plasma standard humain de Dade Behring (étalonnage par rapport au standard OMS 97/586). Les dilutions du standard sont effectuées automatiquement par les automates de coagulation Dade Behring avec le Dade® Tampon véronal d'Owren, selon les paramètres déjà intégrés pour ce test. Le tampon représente le point 0%.

La courbe d'étalonnage peut être vérifiée sur l'automate lui-même ou à l'écran du PC, dans le menu « étalonnage » (se reporter au manuel d'utilisation).

Echantillons de patients

Utiliser les plasmas de patients non dilués. Les dilutions sont effectuées automatiquement par les automates Dade Behring avec le Dade® Tampon véronal d'Owren. Les plasmas de patients sont identifiés par les automates Dade Behring soit en scannant le code barres à l'aide du lecteur code barres, soit en entrant manuellement les données à l'aide du clavier.

Contrôle de qualité interne

Des contrôles sont nécessaires pour garantir l'exactitude et la reproductibilité des résultats. Après chaque étalonnage, et au moins toutes les 8 heures dans une journée de travail, introduire deux contrôles avec des valeurs différentes. Pour cela, utiliser les Plasmas de contrôle N et P. Les préparer et saisir les informations indiquées dans leurs fiches techniques respectives dans l'automate de coagulation Dade Behring. Les contrôles doivent être utilisés non dilués, car les automates de coagulation Dade Behring établissent automatiquement les dilutions.

Si les résultats des contrôles sortent des domaines de confiance, refaire le test. Si la déviation est confirmée dans le deuxième test, refaire une nouvelle courbe d'étalonnage. Ne jamais rendre un résultat de patient avant que la cause de la déviation ait été trouvée et corrigée.

Résultats

Une fois les échantillons chargés dans l'automate de coagulation Dade Behring, le test vWF Ag* est effectué automatiquement, et les résultats sont affichés.

Limites de réalisation du test et High-Dose-Hook Effect

Les automates de coagulation adaptés pour la réalisation de ce test sont ceux pour lesquels Dade Behring propose un protocole spécifique. L'utilisation du test vWF Ag* sur d'autres automates de coagulation doit être validée par le laboratoire utilisateur. Dans ce cas, les caractéristiques du test peuvent varier par rapport à celles indiquées.

Concernant l'influence possible du High-Dose-Hook Effect, de l'hémoglobine, de la bilirubine, de la lipémie ou de l'héparine, se reporter au manuel d'utilisation de l'automate Dade Behring utilisé ou à la fiche technique.

La présence éventuelle et extrêmement rare dans un échantillon de patient d'anticorps anti-albumine bovine et/ou d'anticorps anti-lapin peut entraîner une valeur de vWF Ag* augmentée. La présence de facteurs rhumatoïdes dans le sang peut également entraîner une valeur de vWF Ag* augmentée[6].

Valeurs attendues

Selon la méthode de dosage utilisée, les valeurs de référence varient d'un laboratoire à l'autre. Aussi chaque laboratoire doit-il déterminer son propre domaine de référence. Pour plus de précisions pour la détermination d'un domaine de référence, se référer au document NCCLS C28-A « How to define and determine Reference intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline ».

Le taux plasmatique de vWF Ag* augmente avec l'âge, après la ménopause, pendant les exercices physiques, et en cas de stress[7].

Le taux plasmatique normal de vWF varie généralement de 50 à 160%[8,9].

Caractéristiques du test

Domaine de mesure

Se reporter au manuel d'utilisation de l'automate de coagulation Dade Behring utilisé ou à la fiche technique du test vWF Ag*.

Spécificité

Le test vWF Ag* permet de mesurer spécifiquement le taux d'antigène vWF dans les échantillons plasmatiques.

Précision

Des études de précision ont été effectuées avec les automates de coagulation Dade Behring, et ont porté sur l'évaluation des Plasmas de contrôle N et P.

Le coefficient de variation (CV) dans la série (répétabilité) a été trouvé entre 1,4 et 4,2%.

Le coefficient de variation de jour à jour (reproductibilité) a été trouvé entre 0,9 et 4,2%.

Littérature

Cf. page 1

Dade est une marque déposée de Dade Behring Inc. Aux USA, en Allemagne et dans d'autres pays.

* vWF Ag est une marque déposée de Dade Behring Marburg GmbH en Allemagne et dans d'autres pays. vWF Ag n'est pas disponible aux USA.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

Edition Juin 2002

vWF Ag*

Reagenti per la determinazione immunoturbidimetrica dell'antigene del fattore von Willebrand (vWF Ag*)

Uso previsto

Il kit per il test vWF Ag* della Dade Behring viene utilizzato nella diagnostica in vitro insieme agli analizzatori per coagulazione della Dade Behring e serve per la determinazione quantitativa del vWF Ag* nel plasma umano, mediante immunoturbidimetria.

Significato diagnostico

Il fattore von Willebrand (vWF) è una glicoproteina secreta dalle cellule endoteliali e dai megacariociti[1]. Ha una struttura multimerica con un peso molecolare fino a 15.000 kDa. Dopo la secrezione, può essere decomposta dalla plasmina, a meno che non venga accumulata negli α-granuli dei trombociti dopo assorbimento endocitosico.

Per la sua funzione nell'adesione ed aggregazione piastrinica, il vWF gioca un ruolo importante sia nell'emostasi primaria, per la formazione del tappo emostatico, sia nel processo di coagulazione, per la stabilizzazione del Fattore VIII[2].

Le carenze qualitative e/o quantitative di vWF sono la causa della malattia di von Willebrand (vWD), uno dei più comuni disordini della coagulazione di tipo ereditario, con una frequenza stimata di una persona ogni cento[3]. Presenta un carattere ereditario autosomico dominante. Sono noti tre tipi principali di vWD[4].

Mentre il Reagente BC von Willebrand (Dade Behring) viene utilizzato per la determinazione dell'attività del von Willebrand cofattore ristocetinico (vWF:RCo), il test vWF Ag* serve per determinare il livello di antigene specifico. Entrambi i test servono per la diagnosi differenziale dei vari tipi di vWD.

La vWD di tipo 1 è il tipo più comune, pari al 70-80% di tutti i casi di vWD. E' caratterizzato da una diminuzione di vWF Ag* e dell'attività del vWF. La vWD di tipo 2 è caratterizzata da una carenza qualitativa dell'attività di vWF, dove però il livello di antigene può risultare ancora normale. La vWD di tipo 3 è caratterizzata da una totale mancanza di vWF, sia nel plasma che nei comparti cellulari.

Test	Tipo 1	Tipo 2 A	Tipo 2 B	Tipo 2 N	Tipo 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	Normale	Assente
vWF:RCo	↓	↓↓	↓ o ↓↓	Normale	Assente
Fattore VIII	Normale o ±↓	Normale o ±↓	Normale o ±↓	↓↓	↓↓

Inoltre, è da notare che le carenze di vWF possono essere associate a diverse altre malattie come il Lupus eritemasosus sistemico (LES), il mieloma, il linfoma, ecc. In questi casi si parla di una malattia di von Willebrand acquisita. Il vWF Ag* e l'attività del vWF possono risultare aumentati in tutti i processi infiammatori, come conseguenza delle lesioni dell'endotelio vascolare[4]. I pazienti con infarto del miocardio possono, inoltre, presentare elevate concentrazioni di vWF[5].

Principio del metodo

Le piccole particelle di polistirene, a cui gli anticorpi specifici sono legati con un legame covalente, vengono agglutinate quando sono miscelate con campioni contenenti l'antigene von Willebrand. Tale agglutinazione viene quindi determinata turbidimetricamente, attraverso l'aumento della torbidità, la quale è proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione.

Reagenti

Contenuto della confezione

Codice OPAB: 4 x 6 mL (2 mL Reagente Latex + 4 mL Diluente) di reagente vWF Ag*

Composizione

Il kit vWF Ag* contiene i seguenti reagenti:

Tampone 4 x 5 mL (tampone glicina).

Reagente Latex 4 x 2 mL (tappo verde, sospensione di particelle di làtice ricoperte con anticorpi anti-vWF umano da coniglio)

Diluente per Reagente Latex 4 x 4 mL (tappo verde, soluzione contenente glicina impiegata per la diluizione del reagente Latex).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro.*
2. Quando si impiegano reagenti contenenti sodio azide, osservare le seguenti precauzioni: non ingerire ed evitare il contatto con la cute e le mucose! La sodio azide, a contatto con metalli pesanti come rame e piombo, può formare azidi esplosive.

Preparazione dei reagenti

Tampone:

Prima dell'apertura, lasciare il flacone del tampone a temperatura ambiente (+15/+25°C) per 15 minuti. Agitare delicatamente il flacone.

Reagente Latex:

Versare il contenuto del flacone del Diluente per Reagente Latex (tappo verde) nel flacone del Reagente Latex (tappo verde) dello stesso kit. Assicurarsi che tutto il diluente sia stato versato nel flacone del Reagente Latex. Agitare la miscela, contenuta nel flacone del Reagente Latex, evitando la formazione di bolle. Lasciar riposare la soluzione a temperatura ambiente (+15/+25°C) per 15 minuti, quindi agitare delicatamente.

Diluente per Reagente Latex:

Il diluente è pronto per l'uso.

Conservazione e stabilità

I reagenti nei flaconi originali sigillati, conservati a +2/+8°C, sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Stabilità dopo ricostituzione / dopo apertura (nei flaconi chiusi)

a +2/+8°C 15 giorni
a +15/+25°C 7 giorni

I diversi analizzatori hanno dati di stabilità individuali.

Campioni in esame

Per separare il plasma, miscelare 1 parte di soluzione di citrato di sodio (0,109 mol/L opp. 3,2%) con 9 parti di sangue venoso, evitando la formazione di schiuma. Centrifugare a 2500 x g per almeno 10 minuti, rimuovere il plasma sovranatante e conservarlo a +15/+25°C fino al momento del test, ma non più di 8 ore. I campioni di plasma possono essere conservati a +2/+8°C per 24 ore oppure congelati a -20 / -30°C per 1 mese. I plasmi congelati devono essere scongelati a +37°C per almeno 15 minuti e miscelati prima dell'esecuzione del test.

Esecuzione del test

Fare sempre riferimento ai manuali d'uso, soprattutto quelli relativi alla calibrazione, al caricamento e al controllo qualità.

Materiale necessario ma non fornito

Tampone: Dade® Tampone Veronal di Owren (codice B4234-25)
Per la calibrazione: Plasma umano standard (codice ORKL)
Per il controllo qualità: Plasma di controllo N (codice ORKE) o P (codice OUPZ)
Analizzatori per coagulazione Dade Behring con applicazione per vWF Ag*

Analizzatori per coagulazione

Il vWF Ag* della Dade Behring può essere utilizzato su vari analizzatori per coagulazione. Consultare i relativi manuali d'uso.

Calibrazione

La calibrazione del test viene eseguita con il Plasma umano standard della Dade Behring (calibrato contro lo standard dell'OMS 97/586). Le diluizioni dello standard vengono preparate automaticamente dall'analizzatore per coagulazione Dade Behring con il Dade® Tampone Veronal di Owren secondo i parametri inseriti nell'analizzatore per questo lotto. Il tampone da solo rappresenta il punto 0%.

La curva di calibrazione può essere visualizzata sull'analizzatore stesso oppure sullo schermo del PC nel menu "Calibrazione" (v. manuale d'uso relativo).

Campioni dei pazienti

I plasmi dei pazienti vengono impiegati non diluiti. Le diluizioni con Dade® Tampone Veronal di Owren vengono eseguite automaticamente dagli analizzatori per coagulazione Dade Behring. I plasmi dei pazienti vengono identificati dall'analizzatore per coagulazione Dade Behring o con la scansione del codice a barre oppure inserendo manualmente, tramite tastiera, i loro dati identificativi.

Controllo di qualità interno

E' necessario utilizzare i controlli per garantire l'accuratezza e la riproducibilità dei risultati. Impiegare due controlli con concentrazioni diverse dopo ogni calibrazione e almeno ogni 8 ore di lavoro. Utilizzare il Plasma di controllo N e P. Preparare i controlli ed inserire le informazioni, riportate sulla confezione del plasma di controllo, nell'analizzatore per coagulazione Dade Behring. I controlli vengono utilizzati non diluiti. Le diluizioni vengono preparate automaticamente dall'analizzatore per coagulazione Dade Behring.

Se i risultati dei controlli sono al di fuori dell'intervallo di accettabilità, la determinazione deve essere ripetuta. Se anche questa seconda determinazione conferma la deviazione, è necessario preparare una nuova curva di calibrazione. Rilasciare i risultati dei pazienti solo dopo aver identificato e rimosso le cause della deviazione.

Risultati

Il test vWF Ag* viene eseguito automaticamente dagli analizzatori della Dade Behring dopo aver caricato i campioni ed i risultati vengono visualizzati sullo schermo.

Limitazioni della procedura

Gli analizzatori per coagulazione idonei sono quelli per i quali la Dade Behring mette a disposizione i protocolli analitici. L'utilizzo di vWF Ag* su altri analizzatori deve essere validato dal laboratorio analisi. In tal caso le caratteristiche del test possono differire da quelle indicate.

Fare riferimento al manuale d'uso dell'analizzatore per coagulazione Dade Behring o al foglio applicativo del vWF Ag* per quanto riguarda una possibile interferenza dovuta all'effetto "uncino" ed alla presenza di emoglobina, bilirubina, lipemia o eparina.

La presenza estremamente rara di anticorpi anti-albumina bovina e/o anti-anticorpi di coniglio in alcuni soggetti, può dare sovrastima del vWF Ag*. Anche la presenza di fattori reumatoidi può comportare una sovrastima del vWF Ag*[6].

Valori attesi

I valori di riferimento variano da laboratorio a laboratorio a seconda della tecnica utilizzata; pertanto ogni laboratorio dovrebbe determinare i propri intervalli di riferimento (per maggiori informazioni sulla determinazioni di propri intervalli di riferimento vedere il documento NCCLS C28-A "How to define and determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline"):

Il livello di vWF Ag* nel plasma aumenta con l'età, la menopausa, l'esercizio fisico e lo stress[7].

Il livello normale di vWF Ag* nella popolazione adulta è normalmente compreso nell'intervallo 50 - 160%[8,9].

Caratteristiche specifiche del test

Intervallo di misura

Fare riferimento al manuale d'uso del vostro analizzatore per coagulazione Dade Behring e al foglio applicativo del vWF Ag*.

Specificità

Il test vWF Ag* determina in maniera specifica il livello di vWF antigene nei campioni di plasma.

Precisione

Studi di precisione sono stati eseguiti con analizzatori per coagulazione Dade Behring, analizzando Plasma di controllo P e Plasma di controllo N.

Il coefficiente di variazione (CV) nella serie (precisione intra-assay) è risultato nell'intervallo 1,4% - 4,2%.

Il coefficiente di variazione tra serie (precisione inter-assay) è risultato compreso nell'intervallo 0,9% - 4,2%.

Bibliografia

Vedi pagina 1.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

CE

vWF Ag*

Reactivos para la determinación inmunoturbidimétrica del antígeno del factor von Willebrand (vWF Ag*)

Campos de aplicación

El testkit vWF Ag* de Dade Behring se usa junto con los aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring, en el diagnóstico in vitro y sirve para la determinación cuantitativa del vWF Ag* en plasmas humanos mediante inmunoturbidimetria.

Significado diagnóstico

El factor von Willebrand (vWF) es una glicoproteína, la cual va a ser secretada en el plasma por las células endoteliales y por los megacariocitos[1]. Se trata de una estructura multímera con un peso molecular de hasta 15.000 kDa. Después de ser secretada puede ser descompuesta por medio de plasmina, a no ser que ocurra una toma endocitótica en los gránulos α de los trombocitos.

Debido a su función en la adhesión y agregación de plaquetas sanguíneas, el vWF juega un papel importante tanto en la hemostasia primaria, en la formación de un tapón hemostático, como también en el proceso de coagulación mediante la estabilización del factor VIII[2].

Una deficiencia cualitativa y/o cuantitativa del vWF ocasiona el síndrome de von Willebrand (vWS), el cual es una de las alteraciones hereditarias de la coagulación sanguínea más frecuente, con una frecuencia aproximada de una persona por cada cien[3]. Este síndrome va a ser heredado autosomal dominante. Se conocen tres tipos básicos del vWS[4].

Mientras que con el Reactivo BC de von Willebrand (Dade Behring) se puede determinar la actividad de la ristocetina, cofactor del factor von Willebrand (vWF:Rco), el test vWF Ag* se va a utilizar para la determinación del contenido del antígeno específico. Para la diagnosis diferencial de los diferentes subtipos del vWS son necesarios los dos test.

El vWS tipo 1 es con 70 a 80% el subtipo más frecuente. En está forma el vWF Ag* esta disminuido. El vWS tipo 2 está caracterizado por una deficiencia cualitativa de la actividad del vWF, aunque el contenido de antígeno se puede encontrar en el rango normal. Para el vWS tipo 3 hace falta el vWF completamente en el plasma y en los gránulos celulares.

Test	Tipo 1	Tipo 2 A	Tipo 2 B	Tipo 2 N	Tipo 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	Normal	Falta
vWF: Rco	↓	↓↓	↓ o ↓↓	Normal	Falta
Factor VIII	Normal o ±↓	Normal o ±↓	Normal o ±↓	↓↓	↓↓

Además se debe tener en cuenta, que una deficiencia del vWF también puede estar relacionada con otras enfermedades diferentes, como por ejemplo con lupus eritematoso sistémico, mielomas, linfomas, etc. En este caso, se habla de un síndrome de von Willebrand adquirido. Como consecuencia de daños en el endotelio de los vasos sanguíneos pueden estar el vWF Ag* y la actividad del vWF elevados en toda la clase de procesos inflamatorios[4]. Pacientes con un infarto de miocardio pueden igualmente presentar concentraciones elevadas del vWF[5].

Principio del método

Mediante la mezcla de las muestras que contienen el antígeno de von Willebrand, con el reactivo se van a aglomerar las pequeñas partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpo. Los anticuerpos específicos se van a unir con las partículas mediante uniones covalentes. Finalmente se va a medir esta aglutinación por turbidimetria, determinando el aumento de la turbidez. La turbidez se comporta de forma directamente proporcional al nivel de antígeno en la muestra.

Reactivos

Contenido del envase comercial

N° de pedido OPAB: 4 x 6 ml Reactivo vWF Ag* (2 ml reactivo látex + 4 ml diluyente)

Composición

El kit vWF Ag* contiene los siguientes reactivos:

4 x 5 ml de Tampón (Tampón de glicina)

4 x 2 ml de Reactivo látex (cierre de tornillo verde, suspensión de pequeñas partículas de poliestireno, las cuales están recubiertas con anticuerpo (conejo)).

4 x 4 ml de Diluyente para el reactivo látex (cierre de tornillo verde, solución que contiene glicina, se utiliza para la dilución del reactivo látex)

Advertencias y medidas de seguridad

1. Sólo para ser utilizado en diagnósticos *in-vitro*
2. Al trabajar con reactivos de diagnóstico in-vitro que contengan azida sódica debe observarse lo siguiente:
   ¡No ingerir y evitar cualquier contacto con la piel y las mucosas!. Al eliminar en las aguas residuales lavar con bastante agua. La azida sódica puede formar azidas explosivas con metales pesados, como cobre y plomo.

Preparación de los reactivos

Tampón:

Dejar el frasco del tampón 15 min. a temperatura ambiente (entre +15 y +25°C) antes de abrirlo.

Agitar el frasco suavemente.

Reactivo látex:

Añadir contenido total del frasco de diluyente (cierre de tornillo verde) en el frasco con el reactivo látex (igualmente cierre de tornillo verde) del mismo kit. A continuación agitar la mezcla en el frasco del reactivo, evitando la formación de burbujas. Dejar la solución lista en reposo a temperatura ambiente (entre +15 y +25°C) durante 15 minutos. Después agitar suavemente.

Diluyente para el reactivo látex:

El diluyente viene listo para ser usado.

Estabilidad y almacenaje

Los reactivos almacenados entre +2 y +8°C se pueden utilizar hasta la fecha de vencimiento dada en la etiqueta.

Estabilidad después de la dilución/ después de abierto (en recipiente cerrado)

Entre +2 y +8°C	15 días
Entre +15 y +25°C	7 días

Los diferentes aparatos de medida de la coagulación tienen datos individuales de estabilidad.

Material a investigar

Para separar el plasma mezclar una parte de solución de citrato de sodio (0,109 mol/l o 3,2%) con nueve partes de sangre venosa, evitando la formación de espuma. Centrifugar a 2500 x g por lo menos durante 10 minutos, retirar el plasma sobrante y conservarlo entre +15 y +25°C hasta empezar el test, pero nunca más de 8 horas. Las muestras de plasma almacenadas entre +2 y +8°C pueden mantenerse hasta 24 horas. En estado de ultra congelación (de -20 a -30°C) la estabilidad es de 1 mes. El plasma ultra congelado debe descongelarse a +37°C por lo menos durante 15 minutos antes de empezar el test y mezclarse.

Procedimiento

En todos los casos se deben observar los correspondientes capítulos de los manuales de operación, sobre todo los párrafos sobre calibración, carga y control de calidad.

Materiales adicionales necesarios

Tampón:	Dade® Tampón Veronal de Owren (N° de pedido B 4234-25)
Para la calibración:	Plasma humano estándar (N° de pedido ORKL)
Para el control de calidad:	Plasma control N (N° de pedido ORKE) y P (N° de pedido OUPZ)

Aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring de uso previsto para el vWF Ag*.

Aparatos de medida de la coagulación:

El test vWF Ag* puede ser realizado en diferentes aparatos de medida de la coagulación. Para mayor información al respecto ver los manuales de operaciones correspondientes.

Calibración

La calibración del test va a ser realizada por Dade Behring con plasma humano estándar (Calibración contra el estándar de la OMS 97/586). Las diluciones del estándar van a ser preparadas automáticamente por los aparatos de medidas de la coagulación de Dade Behring de acuerdo con los parámetros ya existentes para el aparato para este test con el Dade® Tampón veronal de Owren. El tampón representa el punto 0%.

La calibración puede ser comprobada directamente en el analizador o en la pantalla de la computadora bajo el menú "Calibración" (Kalibrierung). (ver el manual correspondiente).

Muestra de pacientes

Utilizar los plasmas de los pacientes sin diluir. Las diluciones con el Dade® Tampón veronal de Owren van a ser elaboradas automáticamente por los aparatos de medida de la coagulación. Los plasmas de pacientes van a ser identificados por los aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring por medio de la lectura del código de barras con el Barcode Reader o por medio de la entrada manual de los datos por medio del teclado.

Control de calidad interno

Para poder garantizar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados, se necesitan controles. Después de cada calibración y por lo menos cada 8 horas por día de ensayo se deben medir dos controles diferentes. Para esto se tienen los controles Plasma N y Plasma P. Preparar los plasmas de control y dar a los aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring la información existente en el kit del Plasma control. Los controles se deben usar sin diluir. Los aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring preparan las diluciones automáticamente.

Si los resultados del control se encuentran por fuera del rango de confianza, se debe repetir la determinación. Si después de la repetición se comprueba la desviación, se debe realizar una nueva curva de referencia. No entregar los resultados de las muestras de pacientes hasta que la base de la desviación sea conocida y corregida.

Resultados

El test vWF Ag* va a ser realizado automáticamente una vez el aparato de medida de la coagulación de Dade Behring sea cargado con las muestras y los resultados van a ser dados directamente.

Limitaciones del procedimiento y efecto High-Dose-Hook

Para estas determinaciones son apropiados los aparatos de medida de la coagulación, para los cuales Dade Behring tenga a disposición los protocolos de ensayo. Las determinaciones del vWF Ag* con otros aparatos de medida de la coagulación deben ser validadas por el laboratorio que realiza el test. En estos casos posiblemente las características difieren de las aquí dadas.

Con miras a una posible molestia por medio del efecto High-Dose-Hook, hemoglobina, bilirrubina, lipemia o heparina, se pide observar el manual de operaciones del correspondiente aparato de medida de la coagulación de Dade Behring o el folleto de aplicaciones.

La existencia poco frecuente en los plasmas de pacientes de anti- albúmina bovina y/o anti-anticuerpos de conejo pueden llevar a un valor elevado del vWF Ag*. Igualmente el factor reumatoideo en la sangre puede llevar a una sobrevaloración del vWF Ag*[6].

Valores esperados

De acuerdo al método de determinación utilizado los valores de referencia varían de laboratorio a laboratorio. Por esta razón, cada laboratorio deber determinar su propio rango de referencia. (Mayor información para la determinación del propio intervalo de referencia se puede tomar de los documentos C 28-A del NCCLS "How to define and determinate Reference intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline".

El nivel en el plasma de vWF Ag* aumenta con la edad, después de la menopausia, así como, con al hacer ejercicios y bajo stress[7].

El nivel normal del vWF en el plasma se encuentra normalmente entre 50 y 160%[8,9].

Características del test

Rango de medida

Con relación ha esto por favor observar el manual de operaciones de su aparato de medida de la coagulación de Dade Behring o la información del producto para vWF Ag*.

Especificidad

El test vWF Ag* sirve para la determinación específica del nivel del antígeno vWF en muestras de plasma.

Presición

Estudios de precisión fueron realizados con los aparatos de medida de la coagulación de Dade Behring. En este caso se evaluaron los plasmas de control N y P.

El coeficiente de variación (CV) dentro de una marcha (precisión intra-assay) se encontró entre 1,4% y 4,2%.

El coeficiente de variación día a día (precisión inter-assay) estuvo entre 0,9% y 4,2%.

Literatura

Ver página 1

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

vWF Ag*

Reagentes para a determinação imunoturbidimétrica do antigene do factor von Willebrand (vWF Ag*)

Campo de aplicação

O kit de teste vWF Ag* da Dade Behring é utilizado em conjunto com os aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring para o diagnóstico in vitro e serve para a determinação quantitativa do vWF Ag* no plasma humano, através da imunoturbitimetria.

Significado diagnóstico

O factor de von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína segregada no plasma pelas células endoteliais e pelos megacariócitos [1]. Trata-se de uma estrutura multimérica com um peso molecular até 15.000 kDa. Após a segregação, pode ser decomposta pela plasmina, a menos que se verifique uma assimilação endocitótica nos grânulos α dos trombócitos. Graças à sua função na adesão e agregação das plaquetas sanguíneas, o vWF desempenha um papel importante tanto na hemostase primária com a formação de um tampão hemostático, como no processo de coagulação através da estabilização do factor VIII [2].

A deficiência qualitativa e/ou quantitativa de vWF provoca a síndrome de von Willebrand (vWS), um dos distúrbios hereditários mais comuns da coagulação do sangue, com uma frequência estimada de uma pessoa em cada 100[3]. Possui um modo dominante de hereditariedade autossómico. São conhecidos três tipos principais de vWS[4]. Enquanto que o BC do reagente de von-Willebrand (Dade Behring) pode ser usado para determinar a actividade do cofactor da ristocetina de von Willebrand (vWF:RCo), o teste vWF Ag* é utilizado para determinar o teor do antigene específico. Os dois testes são necessários para o diagnóstico diferencial dos subtipos de vWS.

O tipo 1 de vWS é o subtipo mais frequente ocorrendo em 70 a 80 % dos casos. Esta forma é caracterizada por uma diminuição do vWF Ag*. O tipo 2 de vWS é caracterizado por uma deficiência qualitativa da actividade de vWF, sendo perfeitamente possível que o teor de antigene ainda possa situar-se no intervalo normal. O tipo 3 de vWS é caracterizado pela ausência total de vWF no plasma e compartimentos celulares.

Teste	Tipo 1	Tipo 2 A	Tipo 2 B	Tipo 2 N	Tipo 3
vWF Ag*	↓	↓	±↓	Normal	Ausente
vWF:RCo	↓	↓↓	↓ ou ↓↓	Normal	Ausente
Factor VIII	Normal ou ±↓	Normal ou ±↓	Normal ou ±↓	↓↓	↓↓

Além disso, deverá notar-se que uma deficiência de vWF também pode estar associada com outras doenças várias, tais como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistémico (SLE), o mieloma, o linfoma, etc. Nestes casos, fala-se de um síndroma adquirido de von Willebrand. Como consequência de danificações do endotélio vascular, o vWF Ag* e a actividade de vWF podem sofrer um aumento em todos os tipos de processos inflamatórios[4]. Os pacientes com um enfarte do miocárdio também podem apresentar concentrações de vWF elevadas[5].

Princípio metodológico

Misturando as amostras que contêm o antigene de von Willebrand com o reagente, as pequenas partículas de poliestireno dotadas de anticorpos, aglomeram-se. Os anticorpos específicos combinam-se com as partículas através de ligações covalentes. Seguidamente, esta aglutinação é determinada turbidimetricamente pelo aumento da turbidez. A turbidez é directamente proporcional ao nível de antigene da amostra.

Reagentes

Conteúdo da embalagem comercial

N.º de ref. OPAB: 4 x 6 ml (2ml de Reagente Latex + 4ml de Diluente) Reagente vWF Ag*

Composição

O kit de vWF Ag* contém os seguintes reagentes:

4 x 5 ml de tampão (tampão glicina)

4 x 2 ml de Reagente Latex (tampa roscada verde, suspensão de pequenas partículas de poliestireno revestidas de anticorpos de vWF anti-humanos (coelho).

4 x 4 ml de Diluente para Reagente Latex (tampa roscada verde, a solução contém glicina e é utilizada para diluir o Reagente Latex)

Advertências e medidas de precaução

1. Só para uso diagnóstico *in vitro.*
2. Ao manipular diagnósticos in vitro com teor de azida de sódio, é necessário tomar em conta:

   Evitar a ingestão e o contacto com a pele ou mucosas! Ao eliminar no esgoto, lavar abundantemente com água. A azida de sódio em contacto com metais pesados como o cobre ou o chumbo, pode formar azidas explosivas.

Preparação dos reagentes

Tampão:

Antes de abrir, deixar repousar o frasquinho de tampão durante 15 minutos à temperatura ambiente (+15 a +25°C).

Agitar ligeiramente o frasquinho.

Reagente Latex:

Misturar o conteúdo total do frasquinho do diluente (tampa roscada verde) com o Reagente Latex (tampa roscada igualmente verde) do mesmo kit no frasquinho. Seguidamente, agitar a mistura no frasquinho do reagente, devendo evitar-se a formação de bolhas. Deixar repousar a solução pronta durante 15 minutos à temperatura ambiente (+15 a +25° C). Depois, agitar levemente.

Diluente para Reagente Latex:

O diluente é fornecido pronto para o uso.

Estabilidade e condições de conservação

Conservados à temperatura entre +2 e +8°C, os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade indicada no rótulo.

Estabilidade após a diluição / abertura (em recipiente fechado)

15 Dias à temperatura de +2 a +8°C

7 Dias à temperatura de +15 a +25°C

Os diversos aparelhos de coagulação possuem características de estabilização individuais.

Material de análise

Para separar o plasma, misturar uma parte de solução de citrato de sódio (0,109mol/l ou 3,2 %) com nove partes de sangue venoso, devendo evitar-se a formação de espuma. Centrifugar com 2500 x g durante 10 minutos no mínimo, remover o plasma sobrenadante e conservar entre +15 a +25°C até à utilização do teste, mas não por um período de tempo superior a 8 horas. Em caso de conservação entre +2 e +8°C, as amostras de plasma podem ser conservadas até 24 horas. Se forem congeladas, (– 20 a –30°C) a conservação é de um mês. Descongelar o plasma congelado a +37° C durante 15 minutos, no mínimo, antes da realização do teste e misturar.

Execução do teste

Consultar, em qualquer caso, os capítulos respectivos do manual de utilização, sobretudo as secções sobre a calibração, a carga e o controlo de qualidade.

Outros materiais necessários

Tampão: Dade® Owren's Veronal Buffer (N.º de ref. B 4234-25)

Para a calibração: Standard Human Plasma (N.º de ref. ORKL)

Para o controlo de qualidade: Plasma de controlo N (N.º de ref. ORKE) e P (N.º de ref. OUPZ)

Aparelho de medição da coagulação Dade Behring com a utilização prevista para vWF Ag*.

Aparelho de medição de coagulação

O teste vWF Ag* pode se executado com diversos aparelhos de medição de coagulação. Informações mais pormenorizadas a esse respeito no manual de instruções.

Calibração

A calibração do teste é executada com o Standard Human Plasma da Dade Behring (calibração de acordo com o Standard da OMS 97/586). As diluições de padrão são preparadas automaticamente pelos aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring, de acordo com os parâmetros Dade® Owren's Veronal Buffer já introduzidos nos aparelhos para este teste. O tampão representa o ponto 0%.

A curva de calibração pode ser verificada no próprio analisador ou no ecrã do PC, no menu "Calibração" (vide o respectivo manual de instruções).

Amostras do paciente

Utilizar plasma de paciente não diluído. As diluições com Dade® Owren's Veronal Buffer são preparadas automaticamente pelos aparelhos de medição da coagulação Dade Behring. Os plasmas do paciente são identificados pelos aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring através de scanning do código de barras com um leitor de código de barras ou manualmente, introduzindo os dados com o teclado.

Controlo de qualidade interno

Para garantir a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados, são necessários controlos. Depois de cada calibração e de um mínimo de 8 horas por dia de teste, os controlos deverão ser executados com dois valores diferentes. Utilizar para esse efeito o Plasma de controlo N e P.

Preparar os plasmas de controlo e introduzir a informação contida nos kits do plasma de controlo nos aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring. Os controlos deverão ser utilizados não diluídos. Os aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring preparam as diluições automaticamente. Se o resultado dos controlos se situar fora do intervalo de confiança, a determinação deverá ser repetida. Se o desvio for confirmado pela nova determinação, deverá ser elaborada uma nova curva de referência. Jamais aprovar os resultados das amostras do paciente, antes da causa do desvio ter sido identificada e corrigida.

Resultados

Depois de os aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring terem sido carregados com as amostras, o teste vWF Ag* é executado automaticamente e os resultados são visualizados.

Limitações de execução do teste e efeito High-Dose-Hook

Os aparelhos de medição da coagulação para os quais a Dade Behring disponibiliza protocolos de teste são apropriados para executar as determinações. A determinação de vWF Ag* noutros aparelhos de medição da coagulação, deverá ser validada pelo laboratório de análise. Nestes casos, as características de performance divergem, eventualmente, das indicadas. Em relação a uma possível afectação pelo efeito High-Dose-Hook, hemoglobina, bilirubina, lipemia ou heparina, favor consultar o manual de instruções do respectivo aparelho de medição da coagulação da Dade Behring ou a Application Sheet. A presença extremamente rara de albumina antibovina nas amostras do paciente e/ou anticorpos de coelho anticoelho pode causar um valor sobrelevado de vWF Ag*. O factor reumatóide no sangue também pode provocar uma sobrevalorização de vWF Ag*[6].

Valores expectáveis

Os valores de referência variam de laboratório para laboratório consoante o método de determinação utilizado. Por isso, cada laboratório deverá definir o seu intervalo de referência próprio. (Consultar informações mais pormenorizadas sobre a definição dos intervalos de referência próprios no documento C28-A do NCCLS "How to define and determine Reference intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline". O nível de vWF Ag* no plasma aumenta com a idade, após a menopausa e com os exercícios desportivos sob stress[7].

Normalmente, o nível normal de vWF no plasma movimenta-se entre os 50 e os 160 %[8,9].

Características de performance do teste

Intervalo de medição

A este respeito, favor tomar em consideração o respectivo manual do utilizador do seu aparelho de medição da coagulação Dade Behring ou a informação de produto sobre o vWF Ag*.

Especificidade

O teste de vWF Ag* serve para a determinação específica do nível de antigene vWF nas amostras de plasma.

Precisão

Foram executados estudos de precisão com os aparelhos de medição da coagulação da Dade Behring. Nesse caso, foram avaliados o Plasma de controlo N e o Plasma de controlo P. O coeficiente de variação (CV) na série (precisão intra-ensaio) situou-se entre 1,4 % e 4,2 %.

O coeficiente de variação de dia para dia (precisão inter-ensaio) situou-se entre 0,9 % e 4,2 %.

Bibliografia

Vide a página 1

Dade é uma marca registada da Dade Behring Inc. nos EUA, Alemanha e noutros países.

* vWF Ag é uma marca registada da Dade Behring Marburg GmbH na Alemanha e noutros países. vWF Ag não está à venda nos EUA.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
D-35041 Marburg

CE

	Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Interpretazione simboli / Clave de los Símbolos / Chave dos Símbolos
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device / *In Vitro* Diagnosticum / Dispositif Médical Diagnostic *In Vitro* / Dispositivo Medico per Diagnostica *In Vitro* / Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de Lot / Numero di Lotto / Número de Lote
EXP CCYY-MM-DD	Expiration Date / Verfalldatum / Date de Péremtion / data di scadenza / Fecha de vencimiento / termo da validade
8°C 2°C	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de Conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de armazenagem
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / CE Marca / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence / Codice Catalogo / Número de Catálogo
i	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la Notice d'Utilisation / Istruzioni per l'uso / Consultar Instucciones para el Uso / Consulte as Instruções de Utilização